

## METHOD OF ISOLATING RNA

**Publication number:** JP2002507121 (T)

**Publication date:** 2002-03-05

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

**- international:** C12N15/09; C07H1/08; C07H21/02; C12N15/10; C12N15/09; C07H1/00; C07H21/00; C12N15/10; (IPC1-7): C07H1/08; C07H21/02; C12N15/09

**- European:** C12N15/10A

**Application number:** JP19990505036T 19980625

**Priority number(s):** US19970050719P 19970625; WO1998US13180 19980625

**Also published as:**

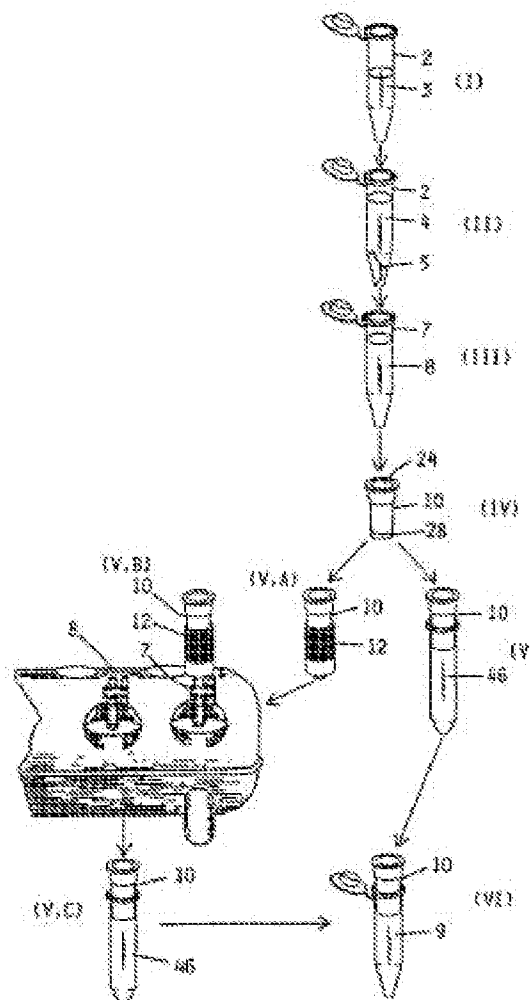
WO9859076 (A1)  
EP1023460 (A1)  
EP1023460 (A4)  
CA2293820 (A1)  
AU8167298 (A)

more >>

Abstract not available for JP 2002507121 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9859076 (A1)**

The present invention provides a method for isolating RNA from a biological material comprising RNA and contaminants, wherein: the biological material is disrupted in the presence of a chaotropic agent, the resulting lysate is diluted to precipitate out contaminants, and the precipitate is removed from the lysate. RNA is preferably isolated from the resulting cleared lysate, using a silica matrix to bind and then release RNA bound thereto under particular conditions. The present invention also provides a method for isolating RNA from a solution comprising RNA and DNA, wherein: the RNA and DNA are bound to a silica matrix in the presence of at least one binding enhancer, the DNA is digested with DNase, and the RNA eluted therefrom.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-507121

(P2002-507121A)

(43) 公表日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード\* (参考)

C 1 2 N 15/09

C 0 7 H 1/08

// C 0 7 H 1/08

21/02

21/02

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願平11-505036

(86) (22) 出願日 平成10年6月25日(1998.6.25)

(85) 翻訳文提出日 平成11年12月24日(1999.12.24)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 3 1 8 0

(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 9 0 7 6

(87) 国際公開日 平成10年12月30日(1998.12.30)

(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 0 , 7 1 9

(32) 優先日 平成9年6月25日(1997.6.25)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 プロメガ コーポレイション

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州

53711-5399 マディソン ウッズ ハロ

ー ロード 2800

(72) 発明者 エッケンバーグ スティーヴン ジェイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州

53572 マウント ホーレブ ペリー セ

ンター ロード 1117

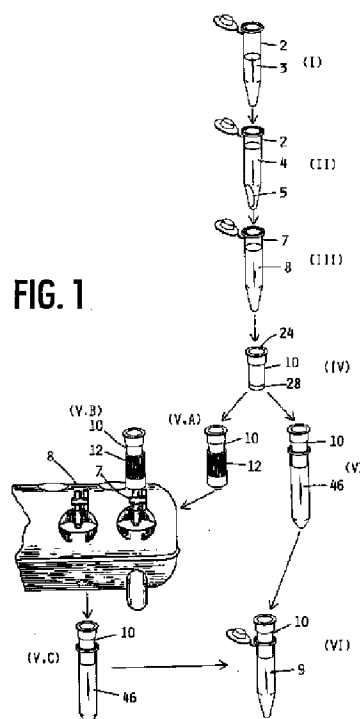
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAの単離方法

(57) 【要約】

本発明は、RNAおよび夾雑物を含む生物材料からRNAを単離する用法を提供する：本方法において、生物材料はカオトロピック塩の存在下で破壊され、生じたライセートは希釈されて夾雑物を沈殿させ、その沈殿はライセートから除去される。RNAは生じた透明ライセートから、特別な条件下でRNAに結合し、その後結合したRNAを遊離させるシリカマトリックスを用いて、優先的に単離される。本発明はまた、RNAおよびDNAを含む溶液からのRNAの単離方法を提供する：本方法において、RNAとDNAは少なくとも1種の結合エンハンサーの存在下でシリカマトリックスに結合し、DNAはDNaseによって消化され、RNAはシリカマトリックスから溶出される。



**【特許請求の範囲】**

1. a) RNAおよび夾雑物を含む生物材料を提供するステップであって、前記夾雑物がDNAおよびタンパク質を含む前記ステップ；  
b) 前記生物材料を第1の容器内で、カオトロピック塩を含む溶解バッファーの存在下で破壊し、それによりライセート溶液および細胞碎片を作り出すステップであって、前記溶解バッファー中のカオトロピック塩の濃度が少なくとも約0.5Mである前記ステップ；  
c) 前記ライセート溶液中の夾雑物の沈殿が形成されるに十分な体積の希釈バッファーを前記ライセート溶液へ添加するステップ；および  
d) 前記希釈ライセート溶液から前記沈殿を除去し、それによって透明ライセートを形成させるステップ  
を含む、生物材料からのRNA単離方法。
2. 生物材料がステップb)においてグアニジン塩カオトロピック塩を含む溶解バッファー存在下で破壊される、請求項1に記載のRNA単離方法。
3. 生物材料がステップb)において、更に界面活性剤およびバッファーを含む、少なくともpHが6から8.5までの溶解バッファー存在下で破壊される、請求項1に記載のRNA単離方法。
4. ライセート溶液がステップc)において、水、塩およびバッファーを含む希釈バッファーで希釈される、請求項1に記載のRNA単離方法。
5. ライセート溶液がステップc)において、界面活性剤を更に含む希釈バッファーで希釈される、請求項4に記載のRNA単離方法。
6. ステップd)において、第1の容器内の前記希釈ライセートを遠心することによって、および、生じた透明ライセートを第2の容器に移すことによって沈殿および細胞碎片が希釈ライセートから除去される、請求項1に記載のRNA単離方法。
7. 更に、  
e) RNAに結合し得るシリカマトリックスを提供するステップ；  
f) デカンテーションした希釈ライセートに試薬混合物を加え、それにより結合混合物を生じさせるステップであって、前記試薬混合物がRNAのシリカマトリッ

クスへの結合を促進するように構成されているものである、前記ステップ；

g) 前記結合混合物を前記シリカマトリックスへ接触させ、RNAとシリカマトリックスの複合体を形成させるステップ；

h) 複合体から前記結合混合物を除去するステップ；

i) 少なくとも1種類の洗浄溶液を前記複合体に添加しこれを除去することによって前記複合体を洗浄するステップ；

j) 前記複合体を溶出バッファーと接触させることにより前記複合体からRNAを溶出させ、それにより前記複合体から前記溶出バッファーへのRNA放出を促進させるステップ；および、

k) 前記複合体から溶出されたRNAを含む溶出バッファーを取り出すステップを含む、請求項1に記載のRNA単離方法。

8. ステップe) で提供されるシリカマトリックスが遠心チューブに適合するように成形されたフィルターバスケットの形態である、請求項7に記載のRNA単離方法。

9. フィルターバスケットを遠心チューブ内に置き、その結果のチューブ/フィルターアセンブリを遠心することによってステップh) において結合混合物が除去され、ステップi) において洗浄溶液が除去される、請求項8に記載のRNA単離方法。

10. ステップe) で提供されるシリカマトリックスが更に真空アダプターに適合し前記アダプターにより真空マニフォールドに取りつけるべく成形されたフィルターバスケットの形態であり、前記真空アダプターと真空マニフォールドを用いた真空濾過によって結合混合物がステップh) で除去され、ステップi) で洗浄溶液が除去される、請求項8に記載のRNA単離方法。

11. ステップf) で希釈ライセート溶液に添加される試薬混合物が、塩化ナトリウム、アルコール、およびカオトロピック塩からなる群より選ばれる、少なくとも1種の結合エンハンサーを含む、請求項7に記載のRNA単離方法。

12. RNA/ マトリックス複合体がステップi) において、バッファーおよび少なくとも30体積%のアルコールを含む洗浄溶液で洗浄される、請求項7に記載のRNA単離方法。

13. 水およびTEバッファからなる群より選ばれる溶出バッファを用いてRNAがRNA/マトリックス複合体から溶出される、請求項7に記載のRNA単離方法。

14. ステップf)で形成される結合混合物がさらにDNAを含み、前記結合混合物がステップg)においてシリカマトリックスと接触させられた場合に形成される、RNAとシリカマトリックスの複合体が、さらにRNAを含み、ステップi)において前記複合体からRNAが溶出される前に前記DNAがDNaseによる消化によって前記複合体から除去される、請求項7に記載のRNA単離方法。

15. ステップi)による複合体の洗浄後であってステップj)による前記複合体からのRNAの溶出前に、

前記複合体をDNaseインキュベーションバッファの存在下でDNaseと接触させるステップ；

前記DNaseと複合体混合物を少なくとも1分間インキュベーションし、DNaseがDNAを消化できるようにするステップ；

前記インキュベーションの終わりに前記複合体へカオトロピック塩混合物を添加するステップであって、前記カオトロピック塩混合物がDNaseを不活性化し複合体中でのRNA維持を促進するに充分な量のカオトロピック塩を含むものである、前記ステップ；

前記カオトロピック塩を前記複合体から除去するステップ；および

前記複合体を再度洗浄ステップj)に従って洗浄するステップを含む追加のステップに従って、DNase消化によりDNAが複合体から除去される、請求項14に記載のRNA単離方法。

16. pHが少なくとも7から9までであるように緩衝化され、少なくとも約1mMの塩化マグネシウムおよび約1Mまでの塩化ナトリウムを含むDNaseインキュベーションバッファの存在下で複合体をDNaseと接触させる、請求項15に記載のRNA単離方法。

17. a) RNA、DNAおよび少なくとも1種の結合エンハンサーを含む結合混合物を提供するステップであって、前記エンハンサーが塩化ナトリウム、アルコール、およびカオトロピック塩からなる群より選ばれる前記ステップ；

b) 得られた前記結合混合物をシリカマトリックスと接触させ、RNAおよびDNA

が前記シリカマトリックスと複合体を形成するステップ；

c) 前記マトリックスに洗浄バッファーを加え前記洗浄バッファーを前記マトリックスから除去することにより前記マトリックスを洗浄するステップ；

d) 前記複合体にDNaseおよびDNaseインキュベーションバッファーを加えるステップ；

e) 生じた前記DNase、前記インキュベーションバッファーおよび前記複体の混合物を少なくとも1分間の間インキュベーションし、前記DNaseが前記DNAを消化するステップ；

f) 前記インキュベーション期間の終わりに、カオトロピック塩混合物を前記複合体へ加えることにより前記DNaseを不活性化し、DNase処理複合体中のRNAのシリカマトリックスへの結合を促進するステップであって、前記カオトロピック塩混合物がカオトロピック塩を含む、前記ステップ；

g) 生じた第2の結合混合物を前記複合体から除去するステップ；

h) 前記複合体へ第2の洗浄バッファーを加え、前記バッファをそこから除去することによって前記マトリックスを洗浄するステップ；

i) 前記複合体へ溶出バッファーを加え、前記バッファーをそこからRNaseフリーの容器へ取り出すことによりRNAをマトリックスから溶出させるステップであって、RNAを溶出させるために使用される前記溶出バッファーの組成が前記マトリックスからのRNAの遊離を促進するように設計されている前記ステップ、を含む、RNAおよびDNAを含む溶液からのRNAの単離方法。

18. インキュベーション期間の終わりに複合体にカオトロピック塩混合物を加えることによりDNaseが不活性化されるステップf)において、前記カオトロピック塩混合物がさらに少なくとも約10%のアルコールを含み、前記カオトロピック塩混合物中のカオトロピック塩が少なくとも1Mギアニジンチオシアネートである、請求項17に記載のRNA単離方法。

**【発明の詳細な説明】****RNAの単離方法****発明の背景**

本発明は生体物質を単離するための器具および方法、特にリボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)のような核酸を、細胞碎片のような生物学的サンプル中の他の物質から単離するための器具および方法に関する。より具体的には、本発明は特に、RNAを単離するための器具および方法の分野、特に、動物および植物組織、培養組織、培養細胞、酵母、バクテリア、血液細胞、ウイルス、あるいは血清のような生物材料から全RNAを単離するための器具および方法の分野に関するが、本発明の範囲をこれに限定する意図は無い。

逆転写、クローニング、制限酵素解析、およびシーケンシングのような多くの分子生物学的技法は生物材料の処理または解析を含んでいる。これらの技法は一般に、そのような材料が、そうした処理または解析手順を妨害し得る夾雑物を本質的に含まないことを必要とする。そのような夾雑物は一般に化学反応(例えば、核酸またはタンパク質ハイブリダイゼーション、酵素触媒反応および分子生物学的技法において使用される他のタイプの反応)を妨害または阻害する物質、核酸または注目している他の生体物質の分解または脱重合を触媒する物質、または、核酸が実際にはサンプル中に存在していないときに、そのサンプル中の注目している生体標的物質の多量の存在を示す「バックグラウンド」を与える物質を含む。また、注目している核酸物質が単離される*in vivo*または*in vitro*媒液からの、酵素、他のタイプのタンパク質、多糖類、またはポリヌクレオチドのような高分子物質、および、脂質、低分子酵素阻害因子、またはオリゴヌクレオチドのような低分子物質も夾雑物に含まれる。また、目的生体物質を他の物質から単離するために使用する化学物質または他の物質から夾雑物が入り込むこともあり得る。最後のタイプの一般的な夾雑物には微量金属、色素、および有機溶媒が含まれる。

分子生物学的適用のために十分に夾雑物フリーのRNAまたはDNAのような核酸を得ることは、その中に核酸が典型的に見られる複雑な系のために複雑なもので

ある。これらの系、例えば、組織からの細胞、血液、リンパ、乳、尿、便、精液その他のような体液からの細胞、培養細胞、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル、または標的核酸増幅が行なわれる溶液は、典型的には注目しているDNAまたはRNAが分子生物学的技法に使用される前にそこから単離されるべきかなりの量の夾雑物を含んでいる。

種々の異なるタイプの生物材料からDNA若しくはRNAまたは特定のタイプのDNA若しくはRNAのような標的核酸を単離するために過去数年にわたって沢山の種々の方法が使用されてきた。例えば、F. Ausubel ら編集の *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley-Interscience, New York (1993) の第2章 (DNA) および第4章 (RNA) を参照せよ。通常の核酸単離プロトコルは生物材料サンプル中に含まれるいかなる標的核酸も破壊溶液中に放出される条件下で生物材料を破壊することから始まる。バクテリア細胞、真核生物組織培養細胞、または血液細胞のような脂質二重膜を備えた細胞は、一般に溶液に懸濁され、緩やかに細胞を溶解して標的核酸を溶液中へ放出させるための酵素および / または化学物質を含む溶解バッファーを加えることによって破壊される。単離すべき核酸がRNAである場合は、生物材料破壊は通常RNAを分解し得るリボヌクレアーゼ (RNase) のような酵素を阻害する条件下で行なわれる。細胞溶解および処理開始ステップの際にRNaseを阻害する通常の方法は、グアニジンチオシアネートのようなグアニジン塩およびβ -メルカプトエタノールを破壊溶液中に含ませることである (Chirgwin (1979) *Biochemistry* 18: 5294)。生物材料が十分に破壊されて標的核酸物質を破壊溶液中に放出したならば、得られた溶液は一般に遠心機でスピンされ、少なくともある程度の細胞碎片および破壊ステップ中で破壊溶液中に形成された一切の沈殿が除去される。次に上清はデカンテーションされ、さらに標的核酸を溶液中の他の夾雑物から分離するために処理される。

また通常の核酸単離プロトコルは一般に、例えばタンパク質および脂質のような細胞性物質を抽出するためにフェノールおよびフェノールとクロロホルムを含む有機混合物を使用し、それが上述のように作られた破壊溶液上清に残存する。フェノール / クロロホルム抽出ステップに続いて、エタノールまたはイソプロパノールなどのアルコールを水性相に添加することにより、抽出水性相に残存す



る

核酸物質の沈殿が行なわれる。沈殿物は典型的には遠心によって溶液から取り出され、得られた沈殿ペレットは乾燥されてから更なる処理または解析のために水またはバッファー溶液に再懸濁される。アルコール沈殿ステップは、従来の核酸単離法においては2つの目的を果たす。具体的には、これにより核酸物質を有機相中の残存フェノールまたはクロロホルムを含む夾雑物から更に単離することができ、かつ、得られた沈殿核酸を所望のいかなる最終核酸濃度でもいかなる溶液にも再懸濁できる。種々のタイプの生物材料から全RNAを単離するための従来の溶解および有機抽出法の例として、SambrookらのMolecular Cloning、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、p. 7.3以下参照；Promega社、Protocols and Applications Guide、第3版(1996)、p. 93以下参照；およびChirgwin, J. M.ら、18 Biochemistry 5249(1979)を参照せよ。これらの文献は全て本明細書に含まれるものとする。Promega社(Madison, WI, USA)を含めて幾つかの異なる企業が生物材料からそのような単離法を用いたRNAまたはmRNAの単離に使用するために設計した試薬を含むキットも開発している。例えば、Promegaから入手可能で、1996年のプロメガ社製品カタログの174頁に記載されている、RNagents® Total RNA Isolation SystemsおよびPolyAtract® Systemsを参照せよ。

従来の核酸単離法はかなりの欠点を有している。それらの欠点の中には、生物材料の破壊によって形成された溶液中に存在する他の物質から、任意の核酸物質を単離するために必要とされる多段階抽出のために要する時間がある。例えば、RNAをタンパク質、脂質、染色体DNA(これらは全て、組織培養細胞または植物または動物組織の破壊から生じた溶液中に存在する)から単離するために多段階抽出が必要である。従来の核酸単離法の他の欠点は、フェノールおよびクロロホルムの使用が必要な事である。フェノールは既知の発癌物質であり、皮膚と接触するとひどい火傷を引き起こす。クロロホルムは高度に揮発性であり、毒性があり可燃性である。フェノールによる有機抽出の他の望ましくない特徴は、フェノールの酸化物が核酸を損傷し得ることである。新たに再蒸留したフェノールのみが

使用可能であり、核酸はフェノール存在下で放置することができない。最後に、核酸物質のいくらかは各有機抽出ステップおよびアルコール沈殿段階において本来的に失われる。従って、最良の状況下においてもそのような従来法は時間のか

かる、有害なものであり、かなり低い単離核酸物質収量を与えるものである。また得られる単離核酸物質はしばしば不純物、特に有機溶媒、アルコールおよび / または非-標的核酸物質 (例えばRNA単離法の染色体DNA夾雑物) によってしばしば汚染している。

更なる解析のために特定の分子量の標的核酸が必要な場合は、分子生物学者はしばしばポリアクリアミドゲルまたはアガロースゲル電気泳動を使用して、前述の従来の方法の一つに従って単離した全RNAまたはDNAまたはRNAとDNAの混合物を分画する。DNAまたはRNAは電気泳動による分画に先だって、通常の方法を使用して、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、またはリンカー結合を使用して処理されて、望みのサイズの、あるいは注目している特定の配列を有するRNAまたはDNAが作られることがある。分画後、分子生物学的方法による解析または処理のためにその画分中の注目のRNAまたはDNAは、そのような電気泳動に使用したゲル中のアガロース、他の多糖類、ポリアクリルアミド、アクリルアミド、またはアクリル酸のような夾雑物から分離されなければならない。上述した全RNAまたはDNAを単離するために使用される方法に似た慣習的な方法が電気泳動ゲル中のそのような夾雑物から核酸物質を単離するために開発されてきた。例えば、所望の分子量の核酸物質がアガロースゲル上で分画された場合は、所望の物質を含むゲル上のバンドをゲルから切り出すことができ以下のように処理することができる。切り出されたバンドは次にアガラーゼ酵素を用いてバンク中で消化することにより処理され、あるいは、核酸物質を切り出したゲル物質のバンドから核酸物質を電気溶出によって取り出すことにより処理される。ゲルから注目している核酸物質を分離するために消化が使用されようと電気溶出が使用されようと、核酸物質は前述したように通常更にフェノールおよびクロロホルムを用いた多段階有機抽出ステップを用いて単離され、続いて、アルコール沈殿が使用されて、得られた核酸物質はアガロースまたはゲル中の他の夾雑物から単離され

る。そのような従来の分画、消化および単離手順は非常に時間のかかるものであり、低収量および有機およびアルコール夾雑物による不純物という、前述した一般的な従来の核酸単離法におけると同様な共通の欠点を有している。

シリカベースの核酸単離技法が上述した従来の単離技法の別法として、あるいはそれに加えて開発されている。これらの別技法においては、ガラス粒子、ガラス粉末、シリカ粒子、ガラス微小繊維、珪藻土、およびそれらの混合物がカオトロピック塩の水性溶液と組み合わされてDNAを単離するため、特にプラスミドDNAを単離するために使用されてきた。米国特許第5,075,430号、および、Markoら、Anal. Biochem. 121, 382-387(1982) および Volgelsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 615-619(1979) を含む、この特許で引用された参考文献を参照せよ。また、Boonら、J. Clin. Microbiol. 28, 495-503(1990) を参照せよ。DNAを他の物質から分離するための、カオトロピック塩の水性溶液と共に使用されるインタクトなガラス繊維フィルターに関しては、ChenとThomas, Anal. Biochem. 101, 339-341(1980) を参照せよ。多数の商業的供給源は遠心または真空濾過を用いたDNA単離のために設計されたシリカベースのマトリックスを提供している。たとえば、Promega社の製品である Wizard<sup>®</sup> Plus SV DNA 精製システム系

列、または Qagen社のDNA単離システム、QaPrep<sup>™</sup> 系列(Chatsworth, California, U.S.A.)を参照せよ。

また、少なくともある種の生物材料からの全RNA単離のためにシリカーベースシステムおよび方法が近年開発されている。例えば、ある会社が、スピンフィルターバスケット中のガラス繊維フィルターおよび、カオトロピック試薬、塩酸グアニジンの高濃度のハイブリッド溶解バッファー / 結合溶液を使用し、培養細胞、血液、酵母、およびバクテリアなどの単純な生物材料から全RNAを単離するRNA単離キットを開発している。例えば、Boehringer-Mannheim GmbH(Mannheim, Germany)のHigh Pure RNA Isolation Kit(カタログ番号1828 665)の製品内容(product insert)を参照せよ。別の会社がシリカゲルベースの膜を備えたスピンバスケットおよびグアニジニウムイソチオシアネートを含む溶解バッファー / 結合溶

液を用いた、バクテリア細胞および組織からの全RNA単離のためのシステムを開発した。例えば、QAGEN社の1994年12月のRNeasy<sup>TM</sup> ハンドブックに記載されている、QAGEN社(Chatswort, California, U.S.A.)のRNeasy<sup>TM</sup> Total RNAキットを参照せよ。簡単に上述したどちらの商業的システムによっても、全RNAを迅速に単離することができるが、それらによって単離されるRNAの収量と純度は

低くなりがちであり、特に植物や動物組織のような複雑な生物材料からRNAを単離するために使用されるときはそうである。

既知のシリカベースのRNA単離技法は任意の生物材料から標的RNAを単離するために同じ基本的な一連のステップを使用する。しかしながら、そのようなそれぞれの方法で使用する種々の溶液の濃度と量は、その方法で使用するシリカベースのマトリックスの構成に依存して変動する。全ての既知のシリカベースのRNA単離法で使用される基本的な一連のステップは、溶解バッファー存在下で生物材料を破壊すること、続いて核酸とシリカマトリックスとの複合体を形成すること、続いて、生じた複合体から溶解バッファー混合物を除去し、その複合体を洗浄すること、続いて、標的核酸をその複合体から溶離させることからなっている。基本的な既知のシリカベースRNA単離技法は以下で詳しく検討する。特に上で引用した2種の商業的シリカベースRNA単離キットを業者の指示に従って使用し、生物材料から全RNAを単離するための器具および方法について特に重点をおいて以下で詳しく検討する。

生物材料に含まれるRNAを破壊の最中および破壊後に酵素的分解から保護するために、シリカベースのRNA単離技法の最初の破壊ステップにおいて使用される溶解バッファーにカオトロピック塩が含まれている。溶解バッファー中のカオトロピック塩の種および量は生ずるライセート中のRNAの(その技法の次のステップにおいてどのような形態のシリカマトリックスが使用されようとも)シリカマトリックスへの結合を促進するように選ばれる。例えば、カオトロピック塩、塩酸グアニジンおよびTriton®X-100(非イオン性界面活性剤)を含む溶解/結合バッファーが、生物材料の破壊に使用するため、および、スピンカラム中のシリカマトリックスへの結合を促進するために提供され、High Pure RNA Isolation Kit

と共に売られている(Boehringer Mannheim GmbH)。RNeasy<sup>TM</sup> Total RNA Kit(QAGEN社)において同じ基本破壊ステップにおいて使用するために提供されている溶解/結合バッファーは、同様なカオトロピック塩であるグアニジニウムイソチオシアネートを含んでいる。

生物材料の破壊に続いてすぐにライセートからの細胞碎片粒子を除去する遠心が行なわれる。High Pure RNA Isolation Kitはこの通常ルールの例外であり、

溶解から直ちにこのキットで提供されているスピнкаラムヘクルードライセートをかけることを要求する。RNeasy<sup>TM</sup> Total RNA Kitで使用される方法を含めて、シリカマトリックスへの接触に先立ちクルードライセートの遠心という前処理を含む単離方法に関して、前処理ステップにおいて除去される細胞碎片の量は典型的には非常に少なく、特にライセート溶液中に本来的に存在する不純物の量に比較して非常に少ない。溶液中に残存する不純物の多く、特にタンパク質、脂質および染色体DNAはシリカマトリックスを詰まらせることがあり、この方法の次のステップにおいてRNA種のマトリックスへの結合と競合することがある。それらの不純物のいくつか、特にタンパク質および染色体DNAは以下のこの方法の最終溶出ステップにおいてRNAと共にマトリックスから共溶出されることもある。動物または植物組織のような複雑な生物材料の溶解は、上述した一般的なシリカベースのRNA単離方法の最初のステップにおいて、溶解溶液中に多数の夾雑物を放出させる。ライセート溶液中の夾雑物の濃度が高いほど、その夾雑物はシリカマトリックスを詰まらせやすくなる。いくつかのシリカベースのマトリックスは目詰まりに非常に敏感であるので、遠心によってライセート溶液を前-清澄化するか否かに拘わらず、複雑な生物材料を処理するのに使用することができない。例えば、培養細胞、血液、酵母およびバクテリアからのRNA単離における使用の指示のみが付いており、より複雑な組織からのRNA単離に使用すると使用不可になる程度に目詰まりし易いBoehringer MannheimのHigh Pure RNA Isolation Kitを参照せよ。

そのような方法においてRNA単離に使用されるシリカマトリックスは一般にはフィルターに含浸させたまたはフィルターを被覆したシリカ材料の形態、樹脂の

形態、または、シリカで被覆された磁気ビーズの形態である。どんな形態で存在するかに関わらず、上述した一般的方法におけるシリカマトリックスは、ライセート溶液中の核酸物質に結合する前あるいはその後で、フィルターバスケット内に置かれる。このフィルターバスケットは典型的には中空のチューブのような形をしており、開口した末端入口部と閉鎖底部末端を備えている。このフィルターバスケットはバスケットの内部にその底部末端において適合する少なくとも1枚のフィルターを有し、その底部は溶液がフィルターを通りバスケットから開口部

を通して流れ出られる開口部を有している。バスケットの底部に適合したフィルターはそのバスケット中にシリカ材料を維持するように設計され、バスケットが遠心や真空のような外力に曝された場合に、破壊された生物材料の溶液がそのフィルターを通して回収チューブ通過できるように設計される。

商業的フィルターバスケットは典型的にはバスケット/チューブアセンブリが標準的な微量遠心機の内部に適合するような様式で標準的なサイズの微量遠心回収チューブに適合すべく設計される。いくつかのフィルターバスケットはまた回収チューブに適合するように設計され、およびフィルターバスケットの底部の一部であるアダプターによって直接的に、あるいは、分離された真空マニフォールドアダプターに適合させることによって間接的に、真空マニフォールドで実質的に気密シールを形成するように設計される。この最後のタイプのフィルターバスケットと分離されたマニフォールドアダプターアセンブリの例に関しては、Promega社のWizard® Plus SV Minipreps Spin Columnsおよびマニフォールドアダプターを参照せよ。スピン濾過のみに使用されるべく設計されたフィルターバスケットアセンブリの例に関しては、上述の二種の商業的RNA単離キット、すなわちRNeasy<sup>TM</sup> Total RNA Kit (QIAGEN社)およびHigh Pure RNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim GmbH)で供給されるスピンカラムを参照せよ。

既知のシリカベースRNA単離法の次の段階において、RNAとシリカマトリックスの結合を促進するに十分な高濃度のカオトロピック塩の存在下でライセート溶液はシリカマトリックスと接触させられる。上述した双方の商業的方法を含む既知のシリカベースRNA単離方法は、その方法の第1ステップで作られるライセート

溶液中に、シリカマトリックスとの結合を促進するカオトロピック塩の充分量を含んでいる。シリカマトリックスと接触させられたならば、ライセート溶液は、遠心または真空濾過のような外力を用いて取り除かれる。上述したように、この溶液除去過程は、複雑な生物材料のライセート中に通常存在するような、マトリックスと接触するライセート溶液中の夾雑物の濃度が高いときは困難ことがある。

ひとたびライセート溶液がシリカマトリックスから取り除かれたならば、このマトリックスは洗浄溶液をマトリックスに適用しそれを除去することを含む一連

の洗浄ステップにおいて洗浄される。

High Pure RNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim GmbH) は上述のようにライセート溶液を除いた後で、その手順の洗浄ステップを開始する前にシリカマトリックスを処理するために設計された試薬を含んでいる。具体的には、High Pure RNA Isolation Kit は凍結乾燥DNase I および1M NaCl、20mM Tris-HCl および10 mM MgCl<sub>2</sub>、pH7.0(25°C) からなるDNaseインキュベーションバッファーを含んでいる。このキットの説明書は凍結乾燥DNaseを水に懸濁し、その懸濁DNaseとインキュベーションバッファーを直接シリカマトリックス、キットで供給されているスピンフィルターバスケットの底部にあるガラス繊維フィルターに加え、溶液を15分間フィルターと接触させたままインキュベーションすることを要求している。次に塩酸グアニジンとエタノールを含む第1の洗浄バッファーがフィルターバスケットに添加され、遠心で除かれる。この第1の洗浄ステップに続いて次にバッファー、塩(非カオトロピック塩)およびエタノールのみを含む第2の洗浄溶液で第2および第3の洗浄ステップが行われる。

High Pure RNA Isolation Kit 法におけるDNase処理ステップは高濃度の塩化ナトリウム塩溶液を使用する。不幸にも、DNase I はそのような高塩溶液中ではかなり活性が低く、従って、低塩バッファーで必要とされる酵素量に比べて同じ量のDNAを消化するのにより多くの酵素を添加しなければならない。より多量のDNaseをシリカマトリックスに加えることにより、最終溶出ステップの前にマトリックスから除去すべき夾雑物の量を増加させることになる。

シリカベースの単離方法における洗浄ステップが完了したならば、RNAは通常低塩バッファーまたは水である溶出バッファーを用いてシリカマトリックスから溶出される。バッファーはマトリックスに適用され、次に遠心によってマトリックスから滅菌回収チューブへ除かれる。残念なことに、上述した2種の商業的RNA単離キットで提供されている業者の指示書に従ってRNAを単離するために使用すると、2種の商業的シリカマトリックスからタンパク質および他の夾雑物が共溶出される傾向がある。また、High Pure Isolation Kit スピンカラムを使用して単離したRNAの収量は他の技法およびシステムを用いたのに比較して低くなりがちである。RNeasy<sup>TM</sup> Total RNA Kit スピンカラムから溶出されるRNAは染

色体DNAが混入しがちである。この特定のキットおよび関連する単離法における染色体夾雑物問題を例示するテスト結果に関しては以下の実施例6および図3を参照せよ。

望まれているのは、生物材料サンプルからRNAを単離する方法であって、それによって単離されたRNAが本質的に夾雑物（タンパク質、脂質、ゲノムDNAおよび単離RNAの処理または解析を阻害若しくは干渉しそうないかなる化学物質を含む）を含まない方法である。本発明は、上述した複数のタイプのシリカマトリックスおよびフィルターバスケットアセンブリおよび一般的な単離技法を用いて、本質的にそのような夾雑物フリーであるRNAを単離するための方法を提供する。本発明のRNA単離方法はRNA高収量を生み出し、従来のRNA単離技法よりも労力集約的でない。本発明の実施によって単離されるRNAはその後の、cDNAライブラリー構築、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、および他の形態の種々の解析の基質のような、そのような夾雑物に敏感な分子生物学的適用に特に適している。本発明を用いて分離または単離されたRNAの他の多くの応用が当業者には明らかであろう。

#### 発明の簡単な要約

簡単に一つの側面を述べると、本発明は生物材料のサンプルRNAを単離する方法であって、

a) RNAおよび夾雑物を含有する生物材料を提供するステップであって、前記夾



雑物がDNAおよびタンパク質を含む、前記ステップ；

b) 第1の容器中で、カオトロピック塩を含む溶解バッファーの存在下で前記生物材料を破壊し、それによりライセート溶液および細胞碎片を作り出すステップであって、前記溶解バッファー中のカオトロピック塩の濃度が少なくとも約0.5Mである前記ステップ；

c) 前記ライセート溶液に充分量の希釈バッファーを加え、ライセート溶液中の夾雑物の沈殿を形成させるステップ；および、

d) 希釈したライセート溶液から沈殿を除去し、それによって透明ライセート溶液(cleared lysate solution)を形成させるステップ、

を含む方法である。

本発明のRNA単離方法の好ましい側面においては、上記の方法のステップd)で形成された透明ライセート溶液中の夾雑物からさらにRNAを単離するためにシリカマトリックスが使用される。本方法の好ましい側面は以下のステップをさらに含む：

e) RNAに結合する能力のあるシリカマトリックスを提供するステップ；

f) 前記透明ライセート溶液に試薬混合物を添加し、それにより結合混合物を形成させ、その結合混合物がRNAの前記シリカマトリックスへの結合を促進するように形成されるステップ；

g) 前記結合混合物を前記シリカマトリックスと接触させるステップであって、RNAが前記シリカマトリックスと複合体を形成するステップ；

h) 前記複合体から前記結合混合物を取り外すステップ；

i) 少なくとも1つの洗浄溶液を前記複合体に加え、前記複合体から前記洗浄溶液を除去することによって前記複合体を洗浄するステップ；

j) 前記複合体を溶出バッファーと接触させ、前記複合体から前記溶出バッファーへのRNAの放出を促進することにより前記複合体からRNAを溶出させるステップ；および

k) 前記複合体から溶出RNAを含む溶出バッファーを取り出すステップを含む。

直前に記載した方法の他の好ましい側面において、ステップ g ) においてシリカマトリックスに添加される結合混合物が DNA を含む場合、およびステップ g ) において結合混合物をシリカマトリックスに添加することによって形成される複合体が RNA、DNA およびシリカマトリックスの複合体を含む場合は、その DNA はステップ j ) において複合体から RNA が溶出される前に DNase で消化することによりその複合体から除去されるのが好ましい。RNA、DNA およびシリカマトリックスの複合体の DNase 消化は以下のステップを含む追加の処理によって行うのが好ましい：

複合体を DNase インキュベーションバッファの存在下で DNase と接触させる

ステップ；

前記 DNase と前記複体の混合物を少なくとも 1 分間インキュベーションし DNase が DNA を消化できるようにするステップ；

インキュベーション期間の終わりにカオトロピック塩混合物を複体に添加するステップであって、前記カオトロピック塩混合物が、DNase を不活性化し複体中の RNA の維持を促進するに十分な量のカオトロピック塩を含んでいる前記ステップ；

複体からカオトロピック塩混合物を除去するステップ；および

洗浄ステップ(j)に従って、再度複体を洗浄するステップ。

また別の側面において、本方法の RNA の単離法は、以下のステップを含む：

a ) RNA、DNA および結合エンハンサーを含む結合混合物を提供するステップであって、前記結合エンハンサーが非カオトロピック塩、アルコール、およびカオトロピック塩からなる群より選ばれるものである、前記ステップ；

b ) 生じた結合混合物をシリカマトリックスと接触させ、RNA と DNA がシリカマトリックスと複体を形成するステップ；

c ) 前記シリカマトリックスに洗浄バッファを加え、そこから前記洗浄バッファを除去することにより前記シリカマトリックスを洗浄するステップ；

d ) DNase および DNase インキュベーションバッファを前記複体に加えるステップ；

e) 得られたDNase、インキュベーションバッファー、および前記複合体の混合物を少なくとも1分間インキュベーションし、DNaseが前記DNAを消化するステップ;

f) インキュベーション期間の終わりに前記複合体へカオトロピック塩混合物を添加することにより、DNaseを不活性化しDNase処理複合体中のシリカマトリックスへのRNAの結合を増強するステップであって、前記カオトロピック塩混合物がカオトロピック塩を含んでいる、前記ステップ;

g) 得られた第2の結合混合物を前記複合体から除去するステップ;

h) 前記複合体に第2の洗浄バッファーを添加し、そこから前記洗浄バッファーを除去することにより前記マトリックスを洗浄するステップ; および

i) 前記複合体に溶出バッファーを添加することによりRNAを溶出し、それをRNase-フリー容器へ取り出すステップであって、RNAを溶出するために使用される前記溶出バッファーの成分が前記マトリックスからのRNAの遊離を促進するように設計されている、前記ステップ。

可逆的にRNAを結合し得るいかなるシリカベースのマトリックスも本発明の方法に使用することができる。しかしながら、シリカマトリックスはフィルターバスケットの底にある、少なくとも1枚のフィルターディスクの表面に取り込まれているか結合していることが好ましい。本発明のRNA単離法の実施に使用されるフィルターバスケットは遠心管に適合し、そのため本発明で使用される1以上の溶液が遠心によりフィルターバスケットから取り出すことができるように設計されていることが好ましい。本発明の方法に使用するフィルターバスケットは更に真空マニフォールドアダプターに適合するように設計され、本発明の1以上の溶液をフィルターバスケットから取り出すために真空濾過を使用するという選択肢を有することができるように設計されるのがより好ましい。本発明の方法に使用する最も好ましいフィルターバスケットおよびアッセンブリは、1996年9月18日出願の米国仮特許出願番号60/026,582に、一般に核酸単離のために最も好ましいとして記載されているフィルターバスケットおよびアッセンブリである。この仮特許出願は本明細書に含まれるものとする。そこで開示されているフィルターバ

スケットとアッセブリの具体的な好ましい実施態様はこの仮特許出願が出願された後市場に導入されており、それは Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemのブランド名でDNA単離システムとして売られている濾過アッ

センブリ、Vac-Man Jr.® 実験室用マニフォールドに嵌合するように設計された真空アダプターを備えたアッセブリアであり、どちらもPr omega社から売られている。

本発明の方法は比較的短時間で、好ましくは1時間より短く、より好ましくは30分より短く、最も好ましくは20分間より短い時間で本質的にインタクトなRNAを単離するために設計されている。ここで用いる用語「本質的にインタクト」とは標準的な核酸電気泳動ゲルで泳動され、エチジウムブロミドあるいはそのよ

うなゲル中の核酸物質を染色するために知られた何らかの化学試薬で染色したゲル上の無傷の対照RNAサンプルに比較して視覚的に分解が見られないRNAを意味する。

本発明の方法の最も好ましい側面に従って単離したRNAはまたDNA、タンパク質、カオトロピック塩を含めた夾雑物を本質的に含まない。ここで用いる用語「夾雑物を本質的に含まない」とは分光光学および電気泳動で解析した場合に検出可能な量のそのような一切の夾雑物を含まず、夾雑物に敏感であることが知られている機能アッセイに使用可能であるRNAを意味する。タンパク質およびカオトロピック塩のどちらの夾雑物も標準的な分光解析技術を用いて検出され得る量で存在しない場合に単離RNAは本質的に夾雑物を含まない。単離RNAは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)における鋳型として使用されるような、敏感な機能アッセイに使用できる場合にも本質的に夾雑物を含まない。単離RNAのRT-PCRによる増幅産物のゲル電気泳動による分画、および、標準的な染色技術あるいは他の検出技術を用いた核酸の検出によって得られたゲル中に染色体DNAバンドが全く検出できないときに単離RNAは夾雑染色体DNAを本質的に含まない。

以下の詳細な説明および実施例中でさらに説明するように、本RNA単離法は本質的に夾雑物フリーである、本質的にインタクトな高収量のRNAを生じさせる迅

速で、効率的で有用な手段を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のRNA単離方法の好ましい側面の流れ図である。この方法で、生物材料が溶解され；希釈されて夾雑物を沈殿させ、そこで生じた沈殿物を除去するために遠心が使用され；真空濾過（図の左系統）またはスピン濾過（図の右系統）によってフィルターバスケット中に含まれる溶液を取り除くために設計されたフィルターバスケットを用いて、生じた透明ライセート溶液からRNAが単離される。

図2は、スピン濾過を用いて（サンプルS1～S6）または真空濾過を用いて（サンプルV1～V6）本発明の単離法およびPromega社の「Wizard® Plus SV スピンフィルター（Spin Filter）」を使用して、あるいはQAGEN社の「RNeasy<sup>TM</sup> スピン

カラム（Spin Column）」によるスピン濾過およびRNeasy<sup>TM</sup> ハンドブック中に開示されているその特別なタイプのスピнкаラムによるRNA単離法法を使用して（サンプルQ1～Q6）マウス肝臓組織から単離された全RNAから作られた蛍光ラベル逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）産物のアガロース電気泳動の画像である。

図3は「Wizard® Plus SV スピンフィルター」および遠心を用いてマウス肝臓組織から単離したRNAの220～300nmの吸光スペクトルである。

図4は「Wizard® Plus SV スピンフィルター」および真空濾過を用いてマウス

肝臓組織から単離したRNAの220～300nmの吸光スペクトルである。

#### 発明の詳細な説明

本発明の方法は、細胞または組織、電気泳動ゲルから抽出したバンド、RNAポリメラーゼ反応物、あるいは部分精製RNA溶液を含む多数の種々の供給源のいずれからでもRNAを単離するために使用することができる。以下の本方法の記載は生物材料からのRNAの単離に関するものだが、それはインタクトな機能のあるRNAを抽出するために上述した供給源のうち、そのような材料がもっとも難しいものからである。しかしながら、この記載は本発明の範囲をそのような供給源のみに限定する意図ではない。本方法は、ランオフ転写反応物または下記の方法と異なる

る方法によって得られた部分単離RNA溶液のような、他の供給源からのRNA単離にも使用することができるからである。

本発明の方法はカオトロピック塩をいくつかの異なる方法で使用する。第1は、そのような試薬は生物材料が十分に破壊されそこに含まれるRNAが溶解溶液中に放出され、RNAを分解しそうな酵素、特にRNaseを不活性化することを保証するために存在する。そのような試薬は、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)のような界面活性剤とともに、核酸-タンパク質相互作用を破壊するように働き、それによって溶液中へのさらなるRNA遊離および溶液中のRNaseのような、そうしなければ溶液中に存在するいかなるRNAも分解するであろう一切の分解酵素の不活性化に働く。また、カオトロピック塩は本発明の方法のいくつかの側面のさらなる処理ステップにおいてシリカマトリックスと接触させてRNAとシリカマトリックスの複合体を形成させる結合混合物中に含めるために選択し得るエンハンサーの

うちに入るものでもある。カオトロピック塩はまた本発明のRNA単離方法のいくつかの好ましい形態において、RNA、DNA、およびシリカマトリックスの複合体をDNaseと一緒にインキュベーション後にDNase混合物に添加されるカオトロピック塩混合物に含まれる。カオトロピック塩混合物中のカオトロピック塩はそれ以上のDNase活性を阻害し、さらなる処理に先だってRNAとシリカマトリックスの複合体の維持を促進する。

カオトロピック塩は本発明の試薬混合物への使用に適した、少なくとも異なる3種の結合エンハンサーの一つにすぎない。他の結合エンハンサーには非-カオトロピック塩(例えば、ナトリウム、カルシウム、リチウム、あるいはカリウム塩、好ましくは少なくとも上記の一つの塩化物)およびエタノールが含まれる。

1種の結合エンハンサーのみが使用される場合は、RNAシリカマトリックス複合体の形成を促進するために必要な混合物中のエンハンサーの濃度は、2以上のエンハンサーが混合物に含まれる場合に比較して高い。1種のエンハンサーのみが使用される場合は、エンハンサーは好ましくは少なくとも30質量%のエタノールあるいは少なくとも0.4Mの塩化ナトリウムのような非カオトロピック塩、あるいはグアニジンチオシアネートのような少なくとも1Mのカオトロピック塩が複合体

生成を促進するために必要とされる。しかしながら、複合体の形成はより低濃度の前記3種の結合エンハンサーの2以上の組み合わせの存在下で生じる。最も好ましい結合混合物はエタノールおよびカオトロピック塩の双方を含む。DNAがRNAと共に結合混合物中に存在している場合は、混合物中の結合エンハンサーの組成はDNAシリカマトリックス複合体の形成よりもRNAシリカマトリックス複合体の形成が好まれるように最適化されるのが好ましい。

カオトロピック塩はカオトロピックイオンの塩である。そのような塩は水性溶液に高度に溶解性である。そのような塩によって提供されるカオトロピックイオンは、タンパク質または核酸の水性溶液中で十分に高い濃度において、タンパク質のフォールディングを解き、核酸の2次構造を緩め、2本鎖DNAの場合は融解(すなわち、鎖を分離)させる。カオトロピックイオンは、液体状の水中に存在している水素結合ネットワークを破壊し、それによって、正しくフォールディングされたあるいは構造化されたカウンターパートよりも変性タンパク質および核

酸を熱力学的に安定にするという理由でこれらの効果を有すると考えられている。カオトロピックイオンにはグアニジニウム、ヨウ化物、過塩素酸塩およびトリクロロ酢酸塩が含まれる。本発明において好ましいのはグアニジニウムイオンである。カオトロピック塩には塩酸グアニジン、グアニジンチオシアネート(時々グアニジンイソチオシアネートと称される)、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、およびトリクロロ酢酸ナトリウムが含まれる。グアニジニウム塩が好ましく、より好ましくは塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアネートであるが、最も好ましいのはグアニジンチオシアネート(GIQ)である。

本発明で使用されるいかなるカオトロピック塩についても、その塩の濃度は、本発明の実施において使用されるその塩のどんな溶液においても、本発明の実施においてその溶液が曝される全ての条件下で溶液中のその塩の溶解度よりも低く維持されることが望まれる。

本発明の方法の好ましい実施態様では、本発明の前処理過程に従って作られた透明ライセートからのRNA単離のためにシリカマトリックスを使用する。RNAを単離するための好ましい方法において使用されるシリカマトリックスは、フィルタ

一バスケット中に取り込まれたシリカマトリックスであることが好ましい。より好ましくは、シリカマトリックスは本法で使用するフィルターバスケットの底部に適合させた少なくとも1枚のフィルターディスクに取り込まれており、更に好ましくは、得られたフィルターバスケットアセンブリはフィルターバスケット中に入れられた溶液を遠心力か、真空濾過か、あるいはその2つの組み合わせによって処理するという選択肢を使用者に与えるべく作られている。フィルターバスケット中で使用される最も好ましいフィルターディスクは、Ansys社、Irvine, California, USAから商業的に入手可能なSPEC<sup>TM</sup> シリカディスクのようなシリカ含浸フィルターディスクである。本発明の方法において最も好ましいフィルターバスケットアセンブリおよびそれらの使用のみを以下において具体的に記載する。しかしながら、本発明は以下で論じる特定の形態のシリカマトリックスまたは特定のバスケットアセンブリ形態に限定されない。

本発明の方法は多数の異なる生物材料供給源のいずれからのRNA単離にも使用することができる。そのような供給源には、培養状態または種々の組織から採ら

れ若しくは得られる真核細胞若しくは原核細胞が含まれる。本方法によって処理され得る生物材料には以下のものも含まれる：植物または動物組織；血液、リンパ、尿、便、または精液を含む動物の体液；または胎児若しくは胎仔からの組織。本発明によりRNAが単離される生物材料は、上述したような材料タイプのような細胞または組織の形態であることが好ましいが、器官、ウイルス、ファージ、プラスミド、ウイロイドの形態、その他の細胞に感染するものであってもよい。どのタイプの生物材料が使用されるかにかかわらず、そのような材料からRNAを単離する方法は溶解溶液存在下でのその材料の破壊、それによりその材料中に存在する一切のRNAを溶液中に放出させることから開始される。生物材料は、RNAを単離し得るライセート溶液を得るための当業者によく知られた沢山の種々の技術のいずれを用いてもこの最初のステップにおいて破壊することができる。そのようなライセート溶液中においても一般にはRNAは他の成分、タンパク質、脂質およびDNAを含む成分と一緒に見いだされるであろう。

本発明の方法の好ましい実施態様に従ってシリカマトリックスを使用してどん



な溶液からRNAを単離するにせよ、好ましいフィルターバスケットアッセンブリのフィルターディスク部品に含浸させたシリカのような、本法で使用するシリカマトリックスに結合し得る形態でRNAが存在していなければならない。ランオフ転写産物または他の供給源から得た部分単離RNAのような比較的少数の夾雑物しか含まない溶液からRNAが単離される場合は、フィルターバスケットへの添加および本法の以下に記載する残りのステップに従った処理に先立ちRNAのマトリックスへの結合を保証するのに必要なレベルまでアルコールを加え、および溶液中のカオトロピック塩の濃度を調整することだけが必要とされる。しかしながら、RNAが組織培養細胞、植物または動物組織、酵母、バクテリア、およびカビのようなより複雑なRNA供給源のサンプルから単離される場合は、そのサンプルはシリカマトリックスとの接触の前に、RNAのマトリックスへの吸着に干渉しそうな少なくともある程度のタンパク質および脂質を除去するために処理されなければならない。そのような複雑な供給源からの本RNA単離方法を実施するために必要な追加のステップは以下に更に説明する。

血液細胞または動物組織のような、どんな複雑な生物材料の処理における最初のステップも、それに含まれる一切のRNAを放出させるための材料の破壊である。細胞からRNAを放出させるために選ばれる具体的な技法はその物質を含む細胞の性質に依存するであろう。例えば、カビの細胞または植物組織のように比較的固い細胞壁を有する細胞または組織からのRNA放出を保証するために典型的には機械的破壊が必要とされる。そのような細胞からそこに含まれるRNAを放出させるに十分に細胞を破壊するためには、溶解バッファー存在下で少なくともそれらの細胞をホモゲナイズしなければならない。ときどきは、溶解バッファー中へRNAを放出させるために、ホモゲナイズに先立ち、あるいはそれに続いて、プロテアーゼによる細胞壁の前消化、または超音波処理の破壊力への曝露のような追加の処理も必要とされる。対照的に、大腸菌バクテリアや真核生物組織培養細胞のような脂質二重膜を有する細胞からは、単に溶解バッファーを細胞に添加するだけでRNAは容易に放出され得る。

本発明の方法に従ってRNAを単離するために処理されるどんな生物材料の破壊

に使用される溶解バッファーもグアニジンチオシアネートのようなカオトロピック塩を含んでいなければならず、少なくとも2Mの濃度で含むことが好ましく、少なくとも4Mの濃度で含んでいることがより好ましい。本方法で使用される溶解バッファーは界面活性剤を含むことも可能であり、その場合界面活性剤はラウリルサルコシナトリウム(SDS)のような穏やかな非イオン性であることが好ましい。溶解バッファーは好ましくはpH6 から8.5の間に緩衝化されており、より好ましくは約7.5のpHに緩衝化されている。カオトロピック塩に加えてRNase阻害剤を溶解バッファー、あるいは本発明の方法の後のステップに使用されるβ -メルカプトエタノール (これに限定されない) を含む、他の溶液に添加することも可能である。

標的RNAが溶解したまたは破壊された生物材料から上述のように放出されたならば、生じたライセート溶液は、本方法の続く処理ステップにおいて標的RNAのシリカマトリックスへの接着と干渉しそうな、高濃度の細胞碎片およびDNAおよびタンパク質を含む夾雑物を含んでいる。次に、ライセート溶液は希釈バッファーを添加することにより希釈される。驚くべきことに、上述した溶液のようなライセート溶液に希釈バッファーを加えると、タンパク質およびDNAを含む夾雑物

のかなりの量が溶液から沈殿の形で落ちてくる。さらに驚くべきことに、シリカマトリックスをRNAの結合およびそれからの放出のために使用してライセート溶液からRNAを単離する場合に、前透明化ステップを行わないときよりも本方法の前処理ステップに従って最初にライセート溶液を透明化した場合の方がRNAを高収量で得られる。このように、本RNA単離方法により、既存のシステムおよび方法、例えば QIAGEN®社の「RNeasy Spin スピンカラム」を用いて単離される RNA

よりも高純度のRNAを高収量で単離することができる(以下の実施例4-6を参照せよ)。

本方法の希釈ステップでライセート溶液を希釈するために使用される希釈バッファーは普通の水であってよいが、一般に使用される、pHが約7.0の塩化ナトリウムとクエン酸ナトリウム塩の混合物 (すなわち、"SSC"溶液) のような塩とバ

ッファーも含むことが好ましく、少なくとも6 x 濃度のSSCバッファーが好ましく、少なくとも約20 x 濃度のSSCバッファーがより好ましい。20 x SSC溶液の組成に関してはSambrookら編集Molecular Cloning第2版、第3巻(1989)B.13頁を参照せよ。より好ましい希釈バッファーは塩、バッファー、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)のような界面活性剤を含む。希釈バッファーが塩を含むときはその塩は塩化ナトリウムが好ましい。

本方法の最初のステップの次には、沈殿物および粒状細胞碎片は濾過または遠心のような種々の除去法のいずれか、但し、好ましくは遠心を使用して希釈ライセート溶液から除去される。希釈ライセート溶液を遠心することによって得られるペレットのサイズは同じライセート溶液を希釈せずに遠心することから得られるであろうペレットの少なくとも2倍大きい。希釈および遠心後に得られるペレットのサイズは本方法の最初のステップで溶解される生物材料の複雑性に依存する。第1の容器中で沈殿した夾雑物および細胞碎片を除去するために遠心が使用される場合は、上清は次に第1の容器から第2の容器へ移され、好ましくは上清はデカンテーションまたはピペティングにより移され、第1の容器中に夾雑物のペレットおよび碎片が残される。これで生じた透明ライセートは多数の異なる方法のいずれか1つに従って、但し好ましくは以下のステップに従って、更に処理する用意ができています。

上述したように、本発明の好ましい方法によって標的RNAが単離される溶液は直接細胞から放出された標的RNAの溶液である必要はない。溶液中の標的RNAは、RNAポリメラーゼおよび適切なプロモータープライマーを用いたプラスミドベクターからのランオフ転写のような、DNAテンプレートからの標的RNAの転写産物であってもよい。また標的RNAは、融解されたまたは酵素的に消化された電気泳動ゲルと核酸物質の混合物の形態でも良い。本方法によって処理される溶液はmRNAのような、部分単離された形態の特定の種類のRNAであってもよい。

上述したように調製された透明ライセートの形態であっても、すぐ直前に記載した溶液のようなより夾雑物の少ない溶液の形態であっても、本方法により処理される溶液は次のステップで以下のように取り扱われる。少なくとも1つの結合

エンハンサー、好ましくはカオトロピック塩、塩化ナトリウムのような非カオトロピック塩、およびアルコールからなる群から選ばれる結合エンハンサーを含む試薬混合物がRNAを単離する溶液に加えられる。試薬混合物は、本方法の続くステップにおいてその溶液からRNAを単離するために使用されるシリカマトリックスへ溶液中のいかなる核酸も結合することを保証するに十分な高い濃度にRNA溶液中の結合エンハンサー濃度を上げるに足る量の、少なくとも1種の結合エンハンサーを含むことが好ましい。

本方法の第2ステップで使用する試薬混合物はアルコールとカオトロピック塩の混合物であることが好ましい。この試薬混合物の好ましい形態におけるカオトロピック塩の濃度は約1Mから6Mの間であることが好ましく、約2Mから5Mであることがより好ましく、約2Mから3Mの間であることが最も好ましい。カオトロピック塩はグアニジンチオシアネートが好ましい。混合物中のカオトロピックイオンの濃度はRNaseを不活性化し混合物中の核酸-タンパク質複合体、特にRNA-タンパク質複合体の破壊を促進するに充分高いことが好ましい。試薬混合物の好ましい形態におけるアルコールの量はRNAが選択的に溶液から沈殿するに充分であることが好ましい。混合物中のアルコールは、エタノールまたはイソプロパノールのような低分子量アルコールであることが好ましく、エタノールがより好ましい。

試薬混合物が透明ライセートまたは他のRNA含有溶液に添加されたならば、生

じた結合混合物はシリカマトリックスと接触させられる。シリカマトリックスがフィルターバスケット内底部のシリカディスクの形態である場合は、この試薬混合物はフィルターバスケット内に入れられることによりシリカディスク中のシリカマトリックスと接触させられる。本方法の残りのステップを説明するために、本方法で使用されるシリカマトリックスの最も好ましい形態が以下で使用される。しかしながら、本発明はこの好ましいシリカマトリックス形態に限定されるものではない。

混合物中のRNAがシリカマトリックスと複合体を(好ましくはフィルターバスケット中のシリカディスクに接着することにより)形成したならば、混合物中の残りの物質はシリカマトリックスから、好ましくは真空または遠心力を用いて、

あるいはその2タイプの力の組み合わせを用いて除去することができる。

図1は、本発明の方法の特に好ましい実施態様によって生物材料からRNAを単離するために使用する最も好ましいフィルターバスケットアッセンブリ形態の使用を説明する流れ図である。ここでは、フィルターバスケットおよびそこに含まれるフィルターバスケットから溶液を除くために真空濾過（流れ図の左経路）または遠心（流れ図の右経路）が使用される。流れ図のステップIは第1の容器2内の生物材料のライセート3を示している。ステップIIは、夾雑物を沈殿させるための希釈後の、溶液からの沈殿および細胞碎片を除去するための遠心後のライセート溶液を示している。ステップIIにおいて第1の容器2は透明ライセート4および沈殿のペレット5および他の夾雑物と共に示されている。ステップIIIは第2の容器7に移され、少なくとも1種の結合エンハンサーを含む試薬混合物を透明ライセートに加えて結合混合物8を形成させた後の透明ライセートを示している。ステップIVにおいて、結合混合物はフィルターバスケットの第1の末端にある開口末端24を通してフィルターバスケットへ移される。次に、溶液中に含まれるRNAおよび他のいくつかの核酸は、フィルターバスケットの底部にあるフィルターディスク28の形態のシリカマトリックスに結合する。次にこの混合物は図1のステップVに記載した2つの経路、一つは溶液を除去するために遠心が使用され、もう一つは除去のために真空濾過が使用されるものだが、そのいずれかを用いてフィルターバスケットから除去される。

遠心経路は図1の流れ図の右枝路に単一ステップVとして記載されている。このステップにおいては、フィルターバスケット10の第2末端は回収チューブ46内に挿入され、次にフィルターバスケット10内の本質的に全ての混合物が回収チューブ46へ流れ落ちるように遠心機でスピンされる。次にフィルターバスケットは回収チューブ46から取り出され、そこに集められた混合物は捨て去られ、フィルターバスケット10は再度回収チューブ46内に設置される。次にフィルターバスケットに洗浄混合物が入れられ、得られたフィルターバスケットおよび回収チューブアッセンブリは再度スピンされてフィルターバスケットから混合物が除去される。この洗浄ステップは所望の回数繰り返すことができる。洗浄ステップが完了

したならば、フィルターバスケットは最後の遠心がなされ、ステップVIに記載したように最後の滅菌回収チューブ9に移される。次にフィルターバスケット10に溶出溶液、バスケット中にあるシリカフィルターディスクに結合している標的RNAを遊離させるために設計された溶液が加えられる。溶離された標的RNAを含む溶出溶液は次に遠心力を使用してフィルターバスケット10から最後の回収チューブ9へ移される。

真空濾過経路は図12の左側にステップVの3つのサブステップの形で示されている。第1のサブステップ、ステップV.Aにおいて、フィルターバスケット10の第2末端は真空マニフォールドアダプター12の第1末端30内の開口部36内へ挿入され、そこで実質的な気密シールを形成する。第2のサブステップ、ス

テップV.B.において、真空マニフォールドアダプター12はVac-Man®実験室用真空マニフォールド8のLuer-Lok®ポート7に取りつけられ、フィルターバスケット10から真空マニフォールド8へ混合物を引き出すために真空圧が使用される。フィルターバスケット10はバスケットへ洗浄溶液を加えその洗浄溶液をフィルターバスケット10から、および真空マニフォールド8へ引き抜くために真空圧を使用することにより少なくとも1回洗浄される。最後に、第3のサブステップ、ステップV.C.において、フィルターバスケット10は真空マニフォールドアダプター12から取り外され、回収チューブ46内に設置され、スピンされてフィルターバスケット内またはその表面上に残っている一切の溶液が除去される。フィルターバスケット10は次に最後の滅菌回収チューブ9に移され、シリカフィルター

ディスクに結合した標的RNAは直前に記載した遠心経路において記載したのと同じタイプの溶出ステップ(ステップVI)を使用して溶出される。

本発明のRNA単離法の洗浄ステップで使用される洗浄溶液は、フィルターバスケットから洗浄溶液を除去するために遠心力が使用されるか真空力が使用されるかに拘わらず、フィルターディスクに結合している標的RNAを外すことなくフィルターバスケットおよびフィルターバスケット内のシリカディスクから物質を除去するために設計された洗浄溶液を用いて全て行なわれる。本方法で使用される洗浄溶液は、塩及び溶媒、好ましくはアルコールを含むことが好ましい。洗浄溶

液のこの最後の好ましい形態においてアルコール濃度は少なくとも30体積%であることが好ましく、少なくとも40体積%であることがより好ましく、少なくとも50体積%であることが最も好ましい。そのように使用されるアルコールは好ましくはエタノールまたはイソプロパノールであり、エタノールがより好ましい。塩はバッファーの形態であることが好ましく、酢酸バッファーの形態であることが最も好ましい。

本発明の方法の特に好ましい実施態様において、単離すべきサンプル中のどんなDNA夾雑物をも消化するためにRNaseフリーのデオキシボヌクレアーゼ(DNase)が使用される。溶解ステップが全く必要でない場合、例えば、RNAが単離されるサンプルが細胞あるいは類似の生物材料の内部に含まれていない場合は、サンプルはカオトロピック塩の添加および後の処理のためにサンプルスピンドリバスケットに装荷するに先だってDNaseで消化することができる。しかしながら、RNAがライセートから単離される場合は、DNase処理ステップは少なくとも1回の洗浄ステップ後にスピンドリバスケット自体の中で行なわれるか、または、RNAサンプルがスピンドリバスケットから溶出された後の最終単離サンプル中に行なわれるのが好ましい。

DNase処理ステップは、少なくとも1回の洗浄ステップの後に以下のようにスピンドリバスケット内で行なわれるのが最も好ましい。DNase処置ステップは、DNaseがその中で活性であるDNaseインキュベーションバッファー中に懸濁されたRNaseフリーDNase酵素溶液を添加することによって開始されるが、より好ましくは、低塩バッファーのような、DNaseがその中で最大の活性となるDNaseインキ

ュベーションバッファーに懸濁されたDNase酵素を添加することによって開始される。最適バッファー条件よりも劣るものが使用された場合、フィルターバスケット中の同じ量のDNA夾雑物を消化するためにより多量のDNaseを添加しなければならない。DNaseインキュベーションバッファーは少なくとも7から9までのpHで緩衝化されていることが好ましい。DNaseインキュベーションバッファーはまた少なくとも約1nMの塩化マグネシウムおよび約1Mまでの塩化ナトリウムを含むことが好ましく、約100nMの塩化ナトリウムを含むことがより好ましい。

次にDNase添加後、フィルターバスケットおよびDNase溶液はDNaseが、シリカフィルターディスクに結合しているDNAを含む、フィルターバスケット中に残っているいかなるDNAとも反応し消化するに十分な時間インキュベーションされる。インキュベーション時間は少なくとも1分間継続することが好ましく、少なくとも5分間がより好ましく、少なくとも15分間継続することが最も好ましい。

インキュベーション期間が終了したならば、RNA/シリカマトリックス複合体の形成と維持に適した条件に溶液条件を調整するためにカオトロピック塩混合物がバスケットに添加されることが好ましい。混合物中のカオトロピック塩成分はまた本来的にDNaseおよびバスケット中に残る他のいかなる酵素をも不活性化する。カオトロピック塩混合物はさらにアルコールを含むことが好ましく、エタノールが好ましい。得られた不活性化インキュベーション混合物は次に上述したように真空濾過または遠心でフィルターバスケットから取り除かれ、バスケットはDNase処理ステップの後、上述のような洗浄溶液を用いて少なくとも1回洗浄される。

本方法の溶出ステップにおいてシリカマトリックスからRNAを溶出させるために使用される溶出溶液は低イオン強度の水性溶液が好ましく、水、または核酸物質が安定で実質的にインタクトであるpH付近の低イオン強度バッファーがより好ましい。TEバッファー(すなわち、10mM Tris-HCl、1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、pH8.0)のイオン強度またはそれより低いイオン強度の水性溶液はいずれも本方法の溶出ステップに使用するために適しているが、溶出溶液は約6.5から8.5の間のpHに緩衝化されていることが好ましく、約7.0から8.0の間に緩衝化されていることがより好ましい。TEバッファーおよび蒸留水また

は脱イオン水は本発明に使用するために特に好ましい溶出溶液である。上述の溶出溶液の好ましい態様である低イオン強度は核酸物質が粒子から遊離することを保証する。本発明の方法の使用に適した他の溶出溶液は当業者には明らかであろう。

本発明の方法を用いてフィルターバスケットから溶出されたRNAは、更なる単離無しに分子生物学的手法による解析または更なる処理に適している。溶出され



たRNAはゲル電気泳動を用いて直接にシーケンシングまたは解析できる。溶出されたRNAはまた核酸プローブハイブリダイゼーションを利用して解析することができ、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用して逆転写することができる。このように本発明の方法はRNAの解析を基礎とした種々の方法の一部、特に病気の診断；病原体の同定；食物、化粧品、血液または血液製品、または他の製品の病原体に関する汚染のテスト；法医学試験；親子鑑定；胎児または胚の性別同定に適用し得る。

以下の非限定的な実施例は本発明の種々の実施態様を教示する。特に断らない限り、以下の実施例で使用するフィルターバスケットアセンブリは「Wizard® Plus Mini preps スピнкаラム」であり、以下では単に「スピнкаラム」という。以下で使用するアセンブリの真空アダプター部品は以下ではMini prep真空アダプターという。これらの実施例は本発明の方法の種々の実施態様または側面の幾つかに過ぎないことは言うまでもない。当業者には本明細書の教示に照らして本発明のさらに多くの実施態様が思い浮かぶであろう。

#### 実施例 1 - 試薬の調製

以下の残りの実施例中で行なわれる方法で使用するために以下の溶液を調製または入手した。

##### 溶解バッファー

4M グアニジンチオシアネート

0.01M Tris pH7.5

0.947% β -メルカプトエタノール (20μl/ml 溶解バッファー)

β -メルカプトエタノールは溶解バッファーを以下に記載するように組織サン

プルを溶解またはホモゲナイズする直前まで加えなかった。

##### 希釈バッファー

20 x SSC

0.25% N-ラウロイルサルフェート(SDS)

滅菌20 x SSCストック溶液はSambrookら、Molecular Cloning第3巻B 13頁(Cold Spring Harbor 出版、1989)に記載されているように調製した。次に20 x SSCをS

DSおよびRNaseフリー滅菌水で上述のSSCおよびSDS最終濃度に希釈した。

#### DNase溶液

5  $\mu$ lの水に懸濁した3,500ユニットのDNaseI (凍結乾燥) ;

および、45  $\mu$ lのDNaseバッファー(0.04M Tris, pH8 ; 0.01M NaCl ; 0.006M MgCl<sub>2</sub> ; および0.01M CaCl<sub>2</sub>)

この溶液を都合のよい量に分けた。使用しない部分は-20°Cで保存した。

#### カラム洗浄溶液

162.8mM酢酸カリウム、27.1mM Tris-HCl、pH7.5を有するTris-酢酸ストック濃縮溶液を調製した。次に、エタノール(EtOH)を以下の最終濃度の洗浄溶液のためにTris-酢酸ストックと混合した :

60% EtOH

60mM KOAcおよび

10mM Tris-HCl pH7.5

### 実施例 2

数匹のマウスから以下に記載する同一のRNA単離法に従って処理するために種々の器官から組織サンプルを調製し、一緒にプールした。従って、その方法によって各器官から単離されたRNAの量および純度を互いに比較することができるであろう。

マウスの肝臓、腎臓、脳、肺、および脾臓組織のそれぞれ6つの30mgサンプルから以下のステップに従って1組の透明ライセートをスピンカラムにかけるために調製した :

1. 各タイプの組織を30mgあたり175  $\mu$ lの溶解バッファーを添加してホモゲナイズした。
2. ホモゲナイズした組織は次に各ホモゲナイズ組織の各タイプあたり少なくとも6つの175  $\mu$ lアリコートにして1.5ml微量遠心チューブへ分取した。70°Cに予熱した350  $\mu$ lの希釈バッファーを各アリコートに加えた。次に各チューブに蓋をし、各チューブを2~3回転倒させることによりチューブの内容物を混合した。
3. 微量遠心チューブを微量遠心機に移し高速で5分間遠心した。次に上清を新

しい微量遠心チューブにデカンテーションで移した。移された溶液の最終体積はチューブあたり約500 $\mu$ lであった。

4. 次に235 $\mu$ lの95%EtOH試薬を各サンプルに加え、転倒によって混合した。

5. 各サンプルチューブの全内容物をデカンテーションでスピンバスケットに移し、以下の2つの実施例のいずれかに記載した方法に従って真空濾過または遠心により各サンプル中のRNAを単離した。

上述したように調製したサンプルを次にスピンバスケットに移し、以下に記載する方法および上記の実施例1に記載した試薬によりスピン濾過によってRNAを単離した：

1. 各スピンバスケットを回収チューブに挿入した。バスケット / チューブアッセンブリを次に微量遠心チューブ内に挿入し、高速で1分間スピンした。スピンサイクルの終わりには、スピンバスケット中の全溶液は回収チューブに移ったように見えた。回収チューブの内容物を捨て去り、さらに処理するため、各スピンバスケットを対応する回収チューブに再度挿入した。

2. 各スピンバスケットに600 $\mu$ lの洗浄溶液を加え、アッセンブリを再度高速で1分間遠心した。各回収チューブの内容物をもう一度捨て去り、スピンバスケットをチューブ内へ再挿入した。

3. 次に回収チューブ / バスケットアッセンブリをチューブラックに設置した。

各調製を行なうため、45 $\mu$ lのDNaseバッファと5 $\mu$ lのDNase酵素の混合物を調製した。新たに調製したこの50 $\mu$ lのDNase溶液を各スピンバスケットに添加し、アッセンブリを室温で15分間インキュベーションした。

4. インキュベーション期間の終わりに、600 $\mu$ lの2.19M GTC溶液を各スピンバスケットに加えた。次に各スピンバスケット / 回収チューブアッセンブリを高速で1分間遠心した。回収チューブの内容物を捨て去りスピンバスケットをそこに再挿入した。

5. 次に600 $\mu$ lのカラム洗浄溶液をスピンバスケットに加え、アッセンブリを再度1分間高速で遠心した。回収チューブの内容物を捨て去り、スピンバスケットをそこに再挿入した。

6. 250 $\mu$ lのカラム洗浄溶液を各スピンバスケットに加え、アッセンプリを高速で2分間遠心した。

7. 次にスピンバスケットを新しい滅菌チューブに移した。RNAをスピンバスケットフィルターから溶出させるために100 $\mu$ lのヌクレアーゼフリーの水を各スピンバスケットに加え、バスケットと新しい滅菌チューブを高速で1分間遠心した。

8. 得られた単離RNAの溶出液を4℃あるいはそれより低温で保存した。

### 実施例 3

次に実施例2に記載したように5つの異なるマウス組織の各々から調製した6つの単離RNAサンプルを、そこで得られた各々のRNAサンプルの収量と純度を決定するために分光光学的に解析した。具体的には、収量は一定量のRNAを260nmで吸光度を測定することによって決定した。ここで、1吸光度ユニット ( $A_{260}$ ) は溶液1mlあたり40 $\mu$ gの1本鎖RNAの濃度を表す。230、260、および280nmにおける相対吸光度は純度のよい指標としても知られている。

以下の表1は、上記の実施例2に記載した遠心法を用いて種々の組織サンプルのテストから得られた純度および収量の結果を示す。表1のそれぞれの数字はそれぞれの組織から得た6つの全てのRNAサンプルから得られた結果の平均値である。表中のそれぞれの収量数値の後のカッコ内に標準偏差を記した。

表1. 種々の組織からのRNAの単離

組織	収量		260/280	260/230
	$\mu$ g/mg 組織	標準偏差		
マウス肝臓	3.19	(0.13)	2.07	2.17
マウス腎臓	1.88	(0.18)	2.08	2.18
マウス脳	0.24	(0.10)	2.68	1.50
マウス肺	0.45	(0.23)	2.08	1.63
マウス脾臓	1.09	(0.26)	2.09	2.07

上記表1中の260/280および260/230の比の結果は、実施例1および2の方法によって種々の組織から単離されたRNAは夾雑物を含まないこと、特にそれらの比を2.0より下げると思われるタイプの夾雑物を含まないことを示している。比2

60/280はタンパク質夾雑物を検出するために使用され、一方比260/230は典型的には微量のグアニジンチオシアネートを検出するために使用される。もし単離RNAのサンプル中に存在すれば、どちらの形態の夾雑物もその後の処理または解析を妨害し得るであろう。実施例3において処理された各組織サンプルから得られた収量は他のRNA単離法を用いて同じタイプの組織から得られる結果と同等かそれよりも高い。

#### 実施例4

6つの30mgマウス肝臓組織からなる3組を処理して3種類の異なる方法と2種類の異なる試薬セットを使用してそれから全RNAを単離した。そのような第1の方法において、RNAは上記実施例2で使用したのと同じ方法により Wizard<sup>®</sup> Plus Mini preps スピンカラムと遠心を用いて単離した。第2の方法では、同じタイプのスピンカラムと同じ試薬を使用し、真空濾過を用いてマウス肝臓サンプルからRNAを単離した。最後に、第3の方法では、RNeasy<sup>™</sup> ハンドブックに記載されているように試薬を調製し、RNeasy スピンカラムと共に、そのRNA単離システムのベンダー、すなわち QIAGEN<sup>®</sup> が推奨するようにそのハンドブックの記載に従って使用してRNAを単離した。

肝臓組織の6つのサンプルの第1組を上記実施例2に記載したのと同じ方法によって処理した。

肝臓組織の6つのサンプルの第2組を実施例2で使用したのと同じ方法によってスピンカラムへの適用のための処理をした。しかしながら、そのサンプルを遠心を用いたスピンカラムにかけずに、以下のように真空濾過を使用した：

1. スピンバスケットをマニフォールドアダプターに設置し真空マニフォールドに取りつけた。次に真空圧を使用してスピニングバスケットからマニフォールド内へ全ての溶液を引いた。
2. 900 $\mu$ lのカラム洗浄溶液を各スピンバスケットに加え、スピンバスケットフィルターからマニフォールドへ真空圧を用いて同様に引いた。この洗浄ステップを一度繰り返した。
3. 次に真空装置を止め、未使用ポートをマニフォールドから真空圧を抜くため

に使用した。全真空圧がマニフールドから解放されたように見えたら、各スピンバスケットにDNase溶液を添加した。スピンバスケット処理のために、45  $\mu$ l DNaseバッファーおよび5  $\mu$ lのDNase酵素のDNase溶液を使用前に調製した。50  $\mu$ lの新しく調製したこのDNase溶液を各スピncラムに加え、室温で15分間インキュベーションした。

4. インキュベーション期間の終わりに、600  $\mu$ lの2.19M GTC溶液を各バスケットに加えた。次に未使用真空マニフールドポートを閉じ、溶液がマニフールド内を通り抜けるように再度真空をかけた。

5. 900  $\mu$ lのカラム洗浄溶液を各スピncラムに適用し、通過させた。同じ洗浄手順を再度繰り返した。

6. 次にスピンバスケットを真空マニフールドアダプターから取り外し回収チューブに挿入した。次に得られたバスケット / チューブアッセンブリを微量遠心チューブ内に置き、高速で2分間スピンした。

7. 次にスピンバスケットを新しい滅菌チューブに移した。RNAをスピンバスケットフィルターから溶出させるため100  $\mu$ lのヌクレアーゼフリーの水を各スピncラムに加え、バスケットおよび新しい滅菌チューブを高速で1分間遠心した。

8. 得られた溶出溶液を4°Cまたはこれより低い温度で保存した。

マウス肝臓組織の6サンプルの第3組はRNeasy Spin Columnを用い、RNeasy Total RNA Purification Protocolsの方法、試薬およびスピncラムを用いて処理した。

#### 実施例5

種々の異なる供給源から実施例4に記載した単離法を用いて単離したRNAの量と質を上記の実施例3に記載したのと同じアッセイ記述を用いて分光光学的にアッセイした。上記実施例4に記載した各方法で単離したRNAから得られた分光光学的な結果を以下の表2～4に記載し、以下の表5にまとめた。

表2. Promegaスピン

No.	吸光度			260/ 280	260/ 230	濃度( $\mu$ g/ml)	収量( $\mu$ g /100 $\mu$ l)
	230nm	260nm	280nm				
S1	0.880889	1.95104	0.940521	2.07	2.21	975.2	97.6
S2	0.855758	1.86453	0.899795	2.07	2.18	932.3	93.2
S3	0.93753	2.0509	0.998153	2.05	2.19	1025.5	102.5
S4	0.847351	1.87686	0.901473	2.08	2.21	938.4	93.8
S5	0.834716	1.86019	0.894607	2.08	2.23	930.1	93.0
S6	0.826644	1.84858	0.886123	2.09	2.24	924.3	92.4

表3 . Prenega真空

No.	吸光度			260/ 280	260/ 230	濃度( $\mu$ g/m l)	収量( $\mu$ g/100 $\mu$ l)
	230nm	260nm	280nm				
V1	1.38282	2.53215	1.27543	1.99	1.83	1266.1	126.6
V2	1.28326	2.51055	1.27079	1.98	1.96	1255.3	125.5
V3	1.36996	2.52447	1.2604	2.00	1.84	1262.2	126.2
V4	1.21948	2.46383	1.24165	1.98	2.02	1231.9	123.2
V5	1.24266	2.53387	1.25479	2.02	2.04	1266.9	126.7
V6	1.34949	2.60375	1.28459	2.03	1.93	1301.9	130.2

表4 . QAGEN( スピン )

No.	吸光度			260/ 280	260/ 230	濃度( $\mu$ g/m l)	収量( $\mu$ g/100 $\mu$ l)
	230nm	260nm	280nm				
Q1	0.628936	1.32658	0.68962	1.92	2.11	663.3	66.3
Q2	0.668762	1.458	0.775894	1.88	2.18	729.0	72.9
Q3	0.750732	1.67729	0.883789	1.90	2.23	838.6	83.9
Q4	0.789428	1.71302	0.898437	1.91	2.17	856.5	85.7
Q5	0.628036	1.4522	0.781402	1.86	2.31	726.1	72.6
Q6	0.725631	1.67994	0.884155	1.90	2.32	840.0	84.0

表5 . 結果の要約

RNA 単離に使用した方法	収量		260/ 280	260/ 230
	$\mu$ g/mg 組織	標準偏差		
スピンバスケット-スピン	3.18	(0.13)	2.07	2.21
スピンバスケット-真空	4.21	(0.07)	2.00	1.94
QIAGEN-スピン	2.59	(0.27)	1.90	2.22

上記の表2～5の結果は、スピンバスケットを使用したRNA単離の遠心法および真空濾過法のいずれも高収量であり、少なくともQIAGENスピンカラムおよび方

法を用いて作られたRNAと同様に夾雑物を含まないRNAを作り出すことを明瞭に示している。

マウス肝臓30mgから遠心によって単離されたそれぞれのRNAを1サンプル、およびWizard® Plus SV Minipreps スピニングカラムを用いて上記実施例4の方法に従って真空濾過によって単離した1サンプルを分光光度計でスキャンした。

遠心を用いて単離したRNAのサンプルのスキャンによって得られた結果を図3に示した。一方、真空濾過を用いて単離したRNAサンプルのスキャンによって得られた結果を図4に示した。上記表2～4に示した、および表5にまとめた他の分光光学的結果と同様に、図3および図4のスキャンは約260nm(核酸について期待される最大吸光度)にピークを持つ滑らかな曲線を示しており、タンパク質が見られると予測し得る波長(すなわち約280nm)において、あるいは、グアニジンイオンが見られると予測し得る波長(すなわち230nm)において曲線の形に検出し得る歪みは示されていない。言い換えると、分光光学的スキャン結果は上

記表5にまとめた個々のピークおよび比の結果と一致している。

#### 実施例6

マウス肝臓から単離した上記実施例4に記載した18サンプルの全RNAの各々の1μgを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)のテンプレートとして使用し、得られた反応産物を以下に記載するようにゲル電気泳動を用いて解析した。このアッセイのために使用したプライマー対は、マウスゲノムDNAのインターロイキン1遺伝子をコードする、少なくとも1つのイントロンを挟む領域にハイブリダイズするプライマー対である。この特定のアッセイに使用したプライマーはマウス5' IL-1β プライマー(5'-AAG GAG AAC CAA GGA ACG AG-3')およびマウス3' IL-1β プライマー(5'-GAG ATT GAG CTG TCT GCT CA-3')である。

単離したRNAの各1μgサンプルを以下のように処理した：

1. RNAサンプルの各々から、各サンプルを密閉したマイクロタイタープレート内において以下のcDNA試薬存在下で37℃にて30分間インキュベーションすることにより第1ストランドcDNA転写物を調製した：

7.4μlの10x RT 9600ゴールドバッファ(Pronega)(40mM Tris-HCl、22



°CにてpH7.95、0.2M KCl、6mM MgCl<sub>2</sub>、8mM DTT、および0.21体積%の黄色素(yellow dye))

各0.15μlの全4種の10mM dNTP

1.2μlのオリゴ(dT)<sub>15</sub>プライマー(0.6mg)

0.75μlのRNasin®リボヌクレアーゼ阻害剤(30u)(Promega)

0.5μlのAMV逆転写酵素(10-12.5u)

2. cDNA合成反応を95°C、5分間の熱不活性化によって停止させ、続いて氷中で5分間冷却した。

3. 上記のステップの間にマイクロタイタープレートの蓋の内側に形成された凝結物を遠心によってプレートのウェル内に集めた。

4. 上記で調製した第1ストランドcDNAの各溶液5μlを微量チューブに移し、45μlのPCRミックスを各微量チューブに加えた。各PCRミックス45μlは以下の成分を含む：

33.8μlのヌクレアーゼフリーの滅菌水

5μlの10x PCRバッファー

(0.1M Tris-HCl、20°CにてpH8.3、15mM MgCl<sub>2</sub>、および0.5M KCl)

各0.975μlの全4種の10mM dNTP

2.5μlの20μM Rウス3' IL-1β プライマー

2.5μlの20μM Rウス5' IL-1β プライマー

0.25μlのTaq DNAポリメラーゼ(1.25u)

5. 次に第1ストランドcDNAおよびPCRミックスのチューブをシールし、サーモサイクラーに移し、以下の温度条件でサイクリングし、RNAおよびそこに含まれるcDNAを増幅した：

予備加熱：95°Cにて1分間1回

サーモサイクリング：94°Cで30秒間、60°Cにて15秒間、および70°Cにて30秒間、合計35サイクル、および

サイクリン後処理：72°Cで5分間

6. 最後のサイクリン後処理ステップの終わりに、微量チューブを湿潤状態の水

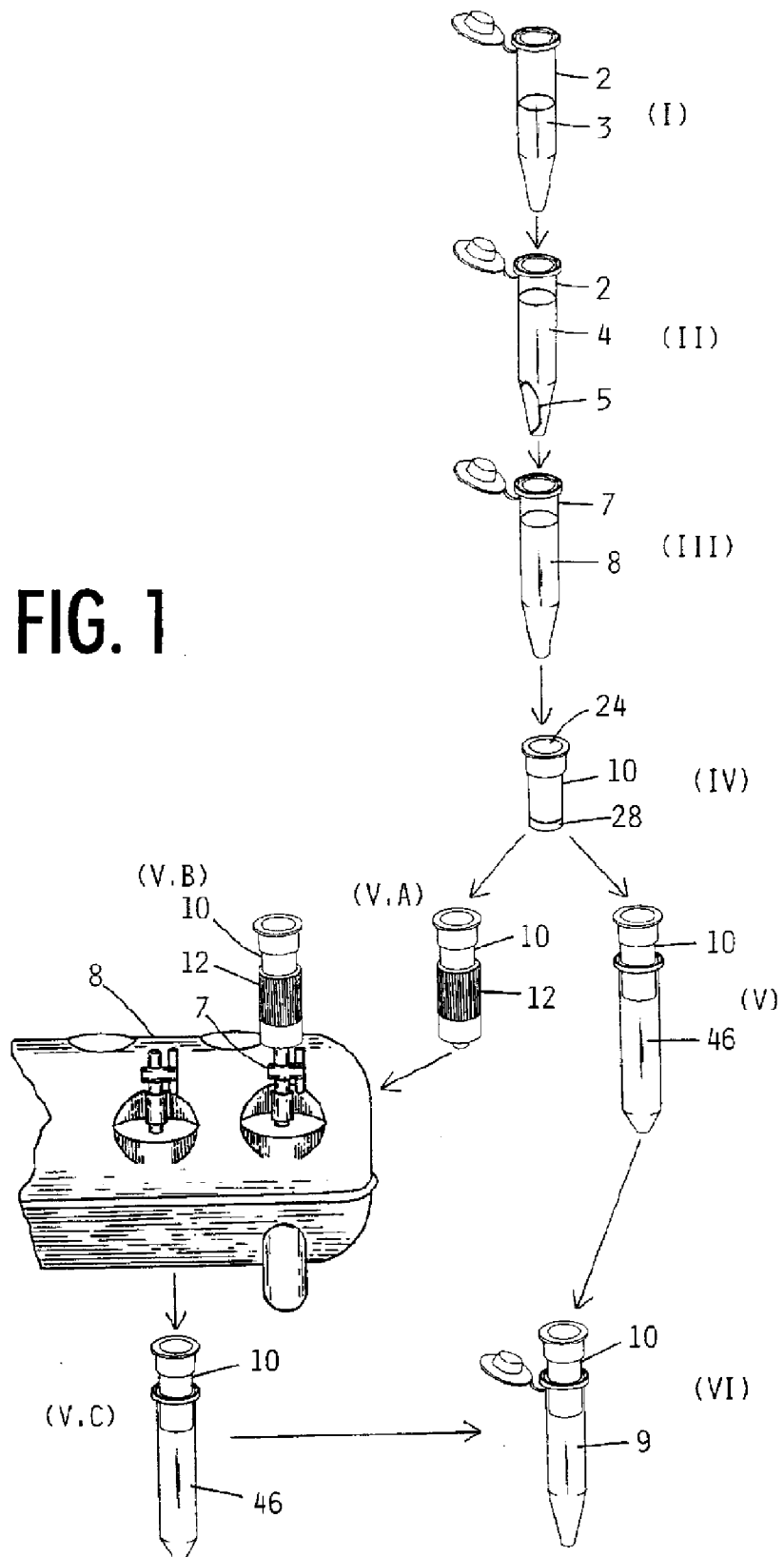
(wet ice)に移し、次のステップで評価できるまで反応結果物を4℃に冷却した。

7. 次に上述のRT-PCR反応産物を以下のようにゲル電気泳動により解析した。10  $\mu$ lの6 x ローディング色素溶液を50  $\mu$ lの上記の各PCRサンプルに加えた。生じた混合物を次に1.5%アガロースゲルに装荷した。このゲルを200Vにて1時間泳動し、次に蛍光色素で染色し自動蛍光画像解析装置を用いて解析した。

図2は上述のように調製したRT-PCRサンプルの電気泳動アガロースゲルの蛍光画像解析装置のスキャンである。電気泳動アッセイの結果は3種の方法、すなわち Wizard® Plus SV Minipreps スピンカラム (サンプル S1~S6) を用いたス

ピン調製、同じスピンカラムを使用した真空濾過(サンプル V1~V6)、および Q AG EN スピンカラムを使用したスピン調製および手順、のいずれに従って単離された RNA も、RT-PCR で処理した場合に インタクト DNA を作り出したことを明瞭に示している。しかしながら、このゲルは Q AG EN カラム および 方法 で単離された RNA は、図2において矢印で印をつけた大きな分子量のバンドによって示されているように、かなりの染色体 DNA 夾雑物を含んでいた事も示している。

【图1】



【図2】

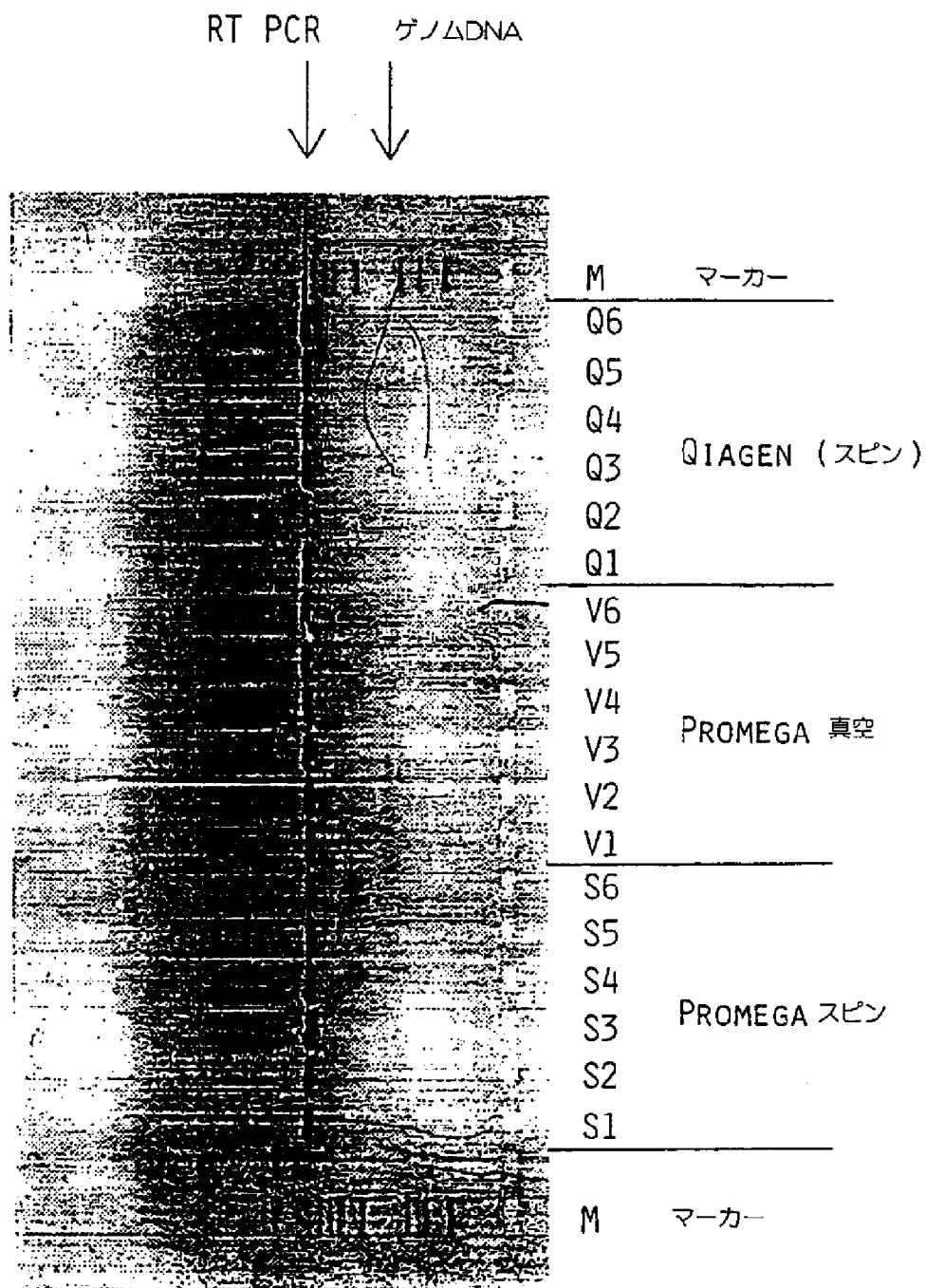


FIG. 2

【図3】

スピン

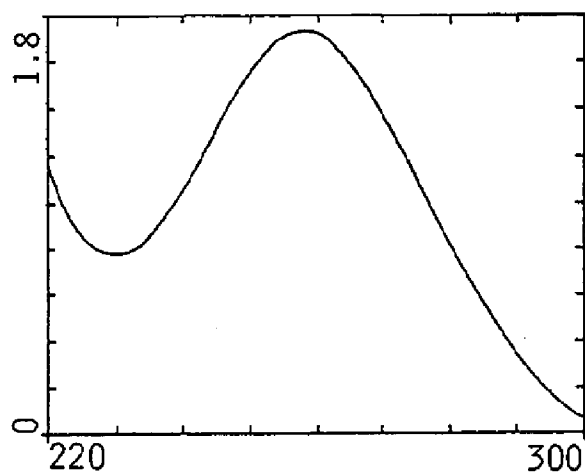


FIG. 3

【図4】

真空

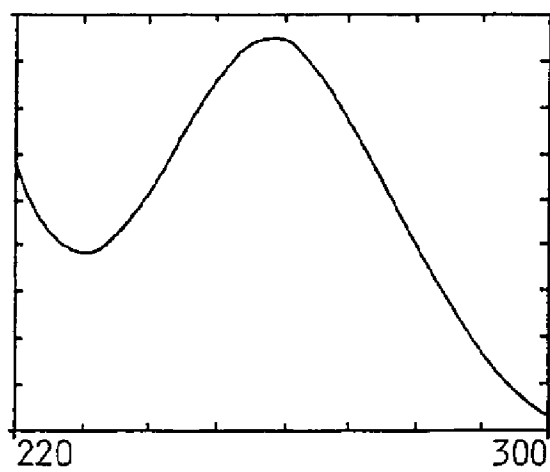
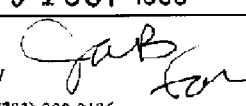


FIG. 4

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US98/13180

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C12M 3/02; C07H 21/00 US CL : 435/6, 91.1, 91.2, 286.6; 536/25.4.2 5.42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2, 286.6; 536/25.4.25.42 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 5,658,548 A (PADHYA et al) 19 August 1997, see entire document, especially column 3-10	1-18
Y,P	INGLIS, P.W. et al. Rapid Isolation of double-stranded RNAs from entomopathogenic species of the fungus <i>Paecilomyces</i> using a commercial minicolumn system. J. of Virol. Meth. 1997, Vol. 67, pages 113-116, especially pages 115-116.	1-18
Y	BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. of Clin. Microbiol. March 1990, Vol. 28, No. 3, pages 495-503, especially pages 495-497.	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "R" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 AUGUST 1998		Date of mailing of the international search report 01 OCT 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JEFFREY SIEW  Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US98/13180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHIRGWIN, J.M. et al. Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. Biochemistry. 1979, Vol. 18, No. 24, pages 5294-5299, especially pages 5294-5296.	1-18
Y	VOGELSTEIN, B. et al. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. February 1979, Vol. 76, No. 2, pages 615-619, especially pages 615-616.	1-18
Y	WO 95/34569 A1 (INVITEK) 21 December 1995 (21.12.95), see abstract.	1-18
X	US 5,155,018 A (GILLESPIE et al) 13 October 1992, see entire document, especially columns 3, lines 16-57.	1-6
Y		7-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US98/13180

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN-CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, WPIDS, GENBANK, SCISEARCH, EMB  
ASE, CANCERLIT, JAPIO, LIFESCI, DISSABS, TOXLINE, AIDSLINE, BIOTECHDS, DGENE, PHIC, PHIN, TOXLIT, NTIS  
SEARCH TERMS: RNA, PURIFI?, ISOLAT?, CHAOTROPIC, DETERGENT, SILICA, VACUUM, FILTER, WASH,  
ENHANCER, DNASE, GUANIDINE THIOCYANATE



-----  
フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ  
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, L  
S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ  
, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL  
, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E  
E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU  
, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M  
D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL  
, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, U  
Z, VN, YU, ZW